

Практикум по клеточной биологии

5 марта 2010 г.

для студентов 1 курса Биологического факультета МГУ
Смирнова Т.А.

Оглавление

I	Методы.	5
1	Световой микроскоп	9
1.1	Микроскопия в проходящем свете	9
1.2	Физические методы контрастирования прозрачных объектов .	9
1.3	Флуоресцентная микроскопия	9
1.4	Конфокальная и двухфотонная микроскопия	9
2	Подготовка препарата	11
2.1	Зачем готовить препараты, и какими они бывают.	11
2.2	Общие приёмы подготовки постоянного препарата	12
2.2.1	Фиксация.	12
2.2.2	Заключение под покровное стекло	14
2.3	Специфика разных препаратов для микроскопии.	15
2.4	Постоянные гистологические препараты.	15
2.4.1	Забой животного или взятие биопсии.	15
2.4.2	Фиксация ткани.	15
2.4.3	Получение гистологических срезов.	17
2.5	Цитологические препараты	20
2.5.1	Мазки и отпечатки.	20
2.5.2	Хромосомные препараты	21
2.5.3	Препараты политенных хромосом	21
2.6	Культура клеток	21
2.6.1	Свойства клеток в культуре	21
2.6.2	Основные приёмы работы с клеточными культурами. .	22
2.6.3	Световая микроскопия монослойных клеточных культур.	24
2.7	Временные препараты	24
3	Окрашивание и избирательное мечение	27
3.1	Общие методы окрашивания фиксированных препаратов . . .	27
3.1.1	Виды красителей.	28
3.1.2	Сложные многокрасочные методы окрашивания. . . .	30
3.2	Избирательное окрашивание фиксированных препаратов. . .	31
3.2.1	Гистохимия.	33
3.2.2	Гибридизация In Situ	37
3.2.3	Иммуноцитохимия	37
3.2.4	Радиоавтография.	38
3.2.5	Способы визуализации специфической метки.	38

3.3	Прижизненное окрашивание.	38
3.3.1	Общие методы прижизненного окрашивания.	38
3.3.2	Избирательное прижизненное окрашивание.	38
4	Электронная микроскопия клеток.	41
4.1	Электронный микроскоп.	41
4.1.1	Формирование изображения.	41
4.1.2	Разрешающая способность.	41
4.1.3	Элементарные основы конструкции просвечивающего электронного микроскопа.	42
4.2	ТЭМ в исследовании ультраструктуры.	43
4.2.1	Подготовка тканей и клеток для ТЭМ.	43
4.2.2	Окрашивание и избирательное мечение в ТЭМ.	43
4.2.3	Осторожно! Что мы видим?	43
4.3	Исследование поверхностей в ТЭМ.	43
4.3.1	Негативное контрастирование.	43
4.3.2	Методы оттенения.	44
4.4	СЭМ.	45

Часть I
Методы.

Введение.

Цель данного раздела — помочь лучше понять, что представляет из себя тот материал и те изображения, с которыми будет проводиться работа на практических занятиях. Для этого целесообразно ознакомиться с основными принципами, возможностями и ограничениями методов, с помощью которых были получены изучаемые препараты. Речь пойдет о методах микроскопии и о способах подготовки материала для наблюдения клеточных структур в световой и электронный микроскоп. Подробное рассмотрение теории микроскопа выходит за рамки данного курса, хотя могло бы быть крайне полезным для более правильной интерпретации получаемых в ходе работы светомикроскопических изображений — с одной стороны, и для получения изображений лучшего качества благодаря правильному использованию микроскопа — с другой.

Данный курс рассчитан, за редкими исключениями, на работу со светомикроскопическими препаратами и микрофотографиями образцов животного происхождения. Поэтому в разделе, посвященном методике приготовления препаратов, описаны методики, рассчитанные на работу именно с этими клетками. По этому же принципу из всего разнообразия выбраны только те методы, которые применялись при приготовлении препаратов для практикума.

Глава 1

Световой микроскоп

- 1.1 Микроскопия в проходящем свете
- 1.2 Физические методы контрастирования прозрачных объектов
- 1.3 Флуоресцентная микроскопия
- 1.4 Конфокальная и двухфотонная микроскопия

Глава 2

Подготовка клеток животного происхождения для светомикроскопического исследования.

2.1 Зачем готовить препараты, и какими они бывают.

Чтобы мелкие детали можно было изучать под микроскопом, надо чтобы они при подготовке препарата сохранились и были отчетливо видны. Поэтому или рассматривают живые клетки (соблюдая при этом нормальные для них условия), или предотвращают изменение их структуры — фиксируют.

Объект должен быть тонким (обычно не более 10 мкм), чтобы быть достаточно прозрачным для наблюдения в обычный просвечивающий световой микроскоп, и чтобы находящиеся вне фокуса объекты не создавали помех в наблюдении. Лучше чтобы граница оптических сред отсутствовала, или хотя бы была ровной — иначе неравномерное рассеяние света сильно исказит изображение. Чтобы увидеть тонкое строение многоклеточных, их тканей и клеток в тканях, как правило, приходится изготавливать срезы.

Разница в пропускании света между различными клеточными структурами обычно очень незначительна. Поэтому чтобы увидеть тонкие структуры, необходимо контрастировать объект. Пользуются или физическими методами контрастирования (например, фазовый контраст), либо препарат окрашивают (этому посвящена глава 3).

Препараты, которые вы сами вставляете в микроскоп на наших занятиях, называются постоянными. Объектом на таких препаратах может быть срез ткани (такие препараты называют гистологическими), отдельные клетки (цитологические препараты, подробнее в главах 2.5.1 и 2.6) или ещё что-нибудь (например, выделенные хромосомы или тонкий ломтик копчёной колбасы, разумеется его тоже придётся зафиксировать чтобы он не пропал, и вообще обработать по всем правилам гистологической техники, про

которые подробнее можно узнать в разделе 2.4).

Очень часто бывает достаточно приготовить временный препарат, который не хранится долго, зато делается намного проще и быстрее.

см гл 2.7, только её нет и пока не будет

Итак,

1. лучше качество изображения, т.к. плоская граница сред либо ее нет
2. красят либо используют специальные методы контрастирования, т.к. объект прозрачен
3. постоянные: срезы, цитологические; окрашенные, меченные
4. временные: срезы, цитологические, прижизненные; окрашенные, меченные, физический контраст.

2.2 Общие приёмы подготовки постоянного препарата

Подготовка постоянного препарата производится с учетом единых принципов. В первую очередь, необходимо зафиксировать материал. После этого, как правило, его окрашивают, либо вводят метку, присоединяющуюся к тем или иным компонентам материала, и делают её видимой. Некоторые виды меток могут вводиться и прижизненно, ещё до фиксации. Тому, как можно окрасить препарат и какие существуют наиболее распространённые приёмы избирательного мечения клеточных компонентов, посвящена глава 3. Если специфика работы не диктует других условий, тонкий слой клеток размещают между покровным и предметным стеклом (см. рис. 2.1).

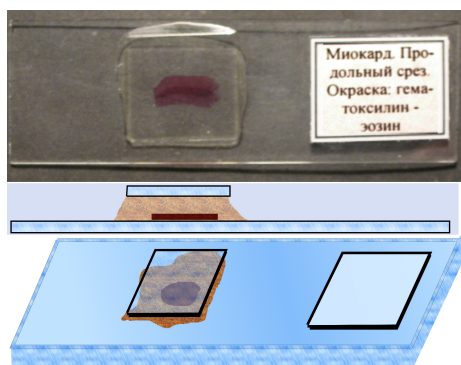


Рис. 2.1: Общий вид гистологического препарата.

Предметное стекло имеет стандартные размеры, его удобно хранить, оно достаточно прочное; на нём расположена этикетка, несущая основную информацию о материале. Покровное стекло предохраняет материал от пыли, механического повреждения, от окисления красителей на воздухе и т.п.. Ровная поверхность покровного стекла позволяет избежать рассеяния лучей на границе сред. Всё пространство между покровным и предметным стеклом заполняется массой, близкой по оптической плотности к стеклу и пропитывающей объект, либо гидрофильной и близкой по оптической

плотности к объекту.

2.2.1 Фиксация.

Важнейшим шагом подготовки препарата является фиксация - обработка, направленная на стабилизацию внешнего вида клеточных структур, расположения компонентов и даже молекул. Фиксация предохраняет эти структуры от посмертных изменений, от действия химических веществ, с которыми контактирует объект во время процедур, производимых при приготовлении препарата, от растворения в водных и спиртовых растворах красителей. Даже когда объект в принципе может наблюдаться прижизненно (например, клетки, выращенные на прозрачной подложке), именно фиксация позволяет различными способами окрасить эти клетки или применить специальные методы избирательного мечения компонентов, например определённых белков или определённой последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах.

Из-за изменений условий окружения, возникающих при изъятии органа или фрагмента органа (отсутствие кровотока; наличие повреждённых клеток в ткани и др.), нарушается работа клетки и её структура, вплоть до гибели клетки. Погибая, клетка разрушается, и опять же её структура претерпевает изменения. Всё сказанное означает, что перед любыми обработками, которым необходимо подвергнуть клетку при подготовке препарата, необходимо произвести фиксацию.

Химическая фиксация

В качестве фиксаторов в гистологических исследованиях часто применяются растворы, действие которых направлено на быстрое осаждение белков и образование с ними нерастворимых ковалентных соединений. По этому принципу действуют, например, формалин, спирт, сулема, уксусная кислота.

Что именно должно быть сохранено при фиксации, зависит от задач исследования. Иногда важно сохранить общую картину строения ткани, тогда фиксатор и последующая обработка не должны вызывать уплотнения и изменения объёма различных компонентов ткани, или приводить к появлению трещин между структурными компонентами с различающейся плотностью, и так далее. Фиксатор в этом случае должен быстро проникать на большую (несколько миллиметров) глубину, чтобы зафиксировать достаточно крупный фрагмент органа. Иногда важнее сохранность определенных клеточных органелл, и выбирается фиксатор, который может не столь быстро проникать вглубь образца, зато обеспечивает хорошую сохранность тонких структур, и особенно исследуемого компонента. Когда исследуется расположение в клетке определенного вещества, будь то липидные включения, железо или что-то ещё, фиксатор должен не только не разрушать их, но и предохранять их от действия клеточных ферментов, которые могут их метаболизировать.

В качестве химических фиксаторов часто используют 4% формальдегид и другие альдегиды, спирты, кислоты, а также смеси на их основе. Свойства нескольких фиксаторов более подробно будут описаны в 2.4, а фиксаторы, применяющиеся для других типов препаратов или наиболее употребляемые для того или иного способа окраски или мечения - упомянуты в соответствующих разделах.

Физические методы фиксации.

Кроме химических, существуют и физические способы фиксации. Как правило, они применяются в специальных задачах гистохимии, в отдельных методах электронной микроскопии.

Остаётся целый ряд проблем, которые полностью не решаются химической фиксацией:

1. потеря веществ, растворимых в фиксаторе;
2. смещение компонентов клетки вследствие диффузии;
3. агрегация в гранулы;

4. денатурация белков, потеря ферментативной активности, антигенных свойств.

Когда обычные способы химической фиксации не могут быть применены, используют быстрое замораживание ткани до температуры приблизительно -160°C . В замороженном образце практически не идет диффузия, прекращается работа ферментов. Основной проблемой является кристаллизация воды: если кристаллы льда становятся крупными, они разрывают мембраны и разрушают клетки, естественно и морфологическая картина при этом будет совершенно нарушена. Однако можно подобрать режим охлаждения таким образом, что сохраняется даже ультраструктура образца.

Охлажденный материал надо обработать так, чтобы при разморозке не продолжились химические процессы, шедшие в нем до заморозки.

Один вариант решения проблемы - лиофильная сушка. Материал выдерживают в вакууме при температуре $-70 - -35^{\circ}\text{C}$, при этом возгоняется большая часть воды, кроме особенно прочно связанной. Теперь перенос в комнатную температуру не приводит ни к повреждению структуры, ни к перераспределению водорастворимых компонентов. Разумеется, материал не нуждается в проводке¹ перед заливкой в парафин. Строго говоря, лиофильная сушка не является фиксацией, и перед длительным контактом с водой срезы должны быть зафиксированы дополнительно.

(про ЭМ)

Другой вариант - замещение в замороженном состоянии - будет более подробно рассмотрен в гл

Итак, фиксация - необходимый шаг в микроскопическом исследовании клеток и тканей.

2.2.2 Заключение под покровное стекло

Последним этапом является заключение материала под покровное стекло.

Чтобы избежать изменения хода лучей на границах покровного и предметного стекол, все пространство между ними заполняется веществом с коэффициентом преломления, близким к стеклу.

Наиболее широко распространён канадский бальзам - однако он не смешивается с водой, поэтому перед заключением в канадский бальзам проводят постепенное вытеснение воды гидрофобными растворителями: препарат последовательно помещают в спирты восходящей концентрации, после абсолютного спирта в ксилол (или толуол, бензол), в которых он хорошо растворим. Бальзам сохраняет окрашенные препараты от окисления воздухом и выцветания, от поражения грибами, просветляет срезы. Застывая, канадский бальзам образует плотную, прозрачную массу, скрепляющую покровное и предметное стекло и сохраняет заключенный таким образом материал десятилетиями в неизменном виде.

¹т.е. обезвоживание путём последовательной смены ряда растворителей, см. раздел 2.4.3

2.3 Специфика разных препаратов для микроскопии.

Следующие разделы посвящены способам подготовки материала для светомикроскопического исследования.

1. гистологические срезы.

После изъятия фрагмента ткани, материал фиксируют, режут, размещают срезы на предметном стекле, окрашивают и заключают под покровное стекло. Обычно режут материал, пропитав его парафином - это придаёт ему дополнительную прочность. В таком случае после фиксации проводят материал по спиртам восходящей концентрации, чтобы обезводить материал, а затем через промежуточные среды, которые смешиваются как со спиртом, так и с парафином; затем пропитывают парафином. Перед окраской готовые срезы освобождают от парафина в промежуточных средах, затем проводят в спиртах нисходящей концентрации, чтобы объект стал доступен для красителя в водных или спиртовых растворах.

2. цитологические препараты: мазки, отпечатки, нанесенные на стекло взвеси клеток и другие.

Препарат готовится на покровном или предметном стекле. Так как из-за малой толщины объектов резка не требуется, после фиксации объект окрашивают и заключают между покровным и предметным стеклом.

3. клетки, выращенные на стекле (метод культуры клеток).

О методе культуры клеток подробно будет рассказано в 2.6. Подготовка препарата технически не будет отличаться от цитологического препарата. Многочисленные достоинства этого метода позволили ему войти в рутинную практику не только клеточной биологии, но и медицинской диагностики, молекулярной биологии и др..

2.4 Постоянные гистологические препараты.

2.4.1 Забой животного или взятие биопсии.

Так как эти действия вызывают болевое раздражение, по этическим соображениям они должны предваряться анестезированием. Способ обезболивания определяется в зависимости от вида животного и особенностей воздействия. С физиологической точки зрения, болевое раздражение ведет к изменениям работы эндокринной, сосудистой и других систем, что может приводить и к изменению морфологии, поэтому также недопустимо. Материал, из которого будут приготавливаться срезы, промывают от крови и повреждённых клеток в солевом растворе.

2.4.2 Фиксация ткани.

Приведем несколько примеров широко распространенных фиксаторов, применяющихся для фрагментов ткани. Как правило, используют именно хи-

мические фиксаторы.

4% формальдегид Формальдегид² обычно готовят, разбавляя 40% нейтральный³ формалин водой в соотношении 1:9. Продолжительность фиксации 1-2 суток при комнатной температуре. Для электронно-микроскопических и гистохимических исследований, где требования к качеству фиксации выше, используют 4% раствор параформальдегида, приготовленный на фосфатном буфере. Достоинством фиксатора является его быстрое проникновение в ткань, поэтому ткань фиксируется даже в 2-3 мм от поверхности, и толщина фиксируемого объекта может достигать 0,5 см. Кроме того, в формалине можно хранить зафиксированный материал. Однако иногда зафиксированный формалином материал плохо заливается в парафин по причине очень сильного уплотнения самой ткани. Сохранность тонких структур не всегда удовлетворительна. Формальдегид не связывает липиды и сохраняет активность некоторых ферментов. В частности, не разрушается липаза - фермент, расщепляющий нейтральные жиры (триглицериды), и в результате её активности жиры не сохраняются после фиксации.

Этиловый спирт Используют для гистохимических реакций по выявлению гликогена, железа и др.. Он осаждает белки, что ведет к частичному обезвоживанию ткани уже во время фиксации и, следовательно, упрощает проводку, однако не сохраняет липиды. Недостатком спирта как фиксатора является и резкое сморщивание ткани. Обычно фиксацию этанолом проводят при +5°C в течение 1-2 часов.

Смесь Карнуа Это один из наиболее распространенных спиртовых фиксаторов. Его выгодно отличает высокая скорость проникновения, что делает возможным использование для фиксации труднопроницаемых объектов (например, насекомых, аскарид). Состав фиксатора:

этанол 100% - 6 мл
хлороформ - 3 мл
уксусная кислота - 1 мл

Фиксируют 0,5-3 часа, проводку начинают сразу с абсолютного спирта.

Жидкость Буэна – один из распространенных многокомпонентных фиксаторов. В нем можно хранить материал. Он универсален (отлично фиксирует эпителиальные ткани, железы, не применяется лишь для почек, семенников и мускулатуры) и хорошо сохраняет общую картину строения ткани. Состав фиксатора:

насыщенный раствор пикриновой кислоты⁴ - 75 мл
40% нейтральный формалин - 25 мл
ледяная уксусная кислота - 5 мл

²10% нейтральный формалин

³Для доведения кислотности раствора до нейтральной (рН 7,0), добавляют приблизительно 100 г Ca_2CO_3 на 1 л формалина.

⁴2,4,6-Тринитрофенол, или пикриновая кислота, используется как компонент многих фиксирующих смесей. Пикриновая кислота осаждает белки и образует с ними химические соединения. Для приготовления насыщенного раствора 25-30 г кристаллической кислоты заранее разводят в 1 л горячей дистиллированной воды, избыток кислоты выпадает в осадок.

Фиксируют несколько часов при комнатной температуре, затем проводку начинают сразу с 70-80% спирта.

Фиксатор Ценкера – один из множества фиксаторов, содержащих сулему⁵. Универсален, в частности прекрасно фиксирует кожные покровы. Состав фиксатора:

хлорид ртути (II) 5 г
бихромат калия 2,5 г
сульфат натрия 1 г
вода дистиллированная 100 мл
ледяная уксусная кислота 5 мл⁶

Фиксируют 1-24 ч в темноте, промывают водопроводной водой до обезвреживания, затем удаляют сулему сначала в 70% спирте, затем спиртовым раствором йода (60 мл 70% спирта: 1 мл 10% йодной настойки: 10 мл раствора Люголя⁷); йод удаляют 70% спиртом. Фиксированный материал хранят в 70% спирте.

Смесь Альтмана используется при изучении митохондрий и жировых включений. Состав фиксатора:

бихромат калия 5% 2 мл
осмиевая кислота 2% 5 мл
Фиксируют 24 часа.

Отсутствие единства объясняется тем, что все они имеют достоинства и недостатки, связанные со скоростью проникновения вглубь образца, со скоростью собственно фиксации, лучшей или худшей сохранностью отдельных клеточных структур или химических компонентов, степенью сжатия или набухания ткани в целом, и другие.

2.4.3 Получение гистологических срезов.

Обычно изготавливают срезы толщиной 3-10 мкм. Более толстые срезы менее прозрачны и сильнее рассеивают свет, что ухудшает качество получаемого изображения. Так как обычно ткани, даже зафиксированные, мягкие, они деформируются и повреждаются при резке. Поэтому ткань пропитывают массой, имеющей достаточную прочность для того, чтобы избежать механического повреждения. Для большинства мягких тканей применяется заливка в парафин. Чтобы парафин мог проникнуть вглубь образца, проводят постепенную замену воды растворителями, смешивающимися с парафином.

Обезвоживание и заливка в парафин После фиксации и промывки от фиксатора, проводят обезвоживание по спиртам восходящей концентрации.

⁵хлорид ртути (II), или сулема, осаждает белки, вызывает значительное затвердевание ткани (но в меньшей степени, чем этанол и формальдегид). Содержащие сулему фиксаторы улучшают способность ткани к окрашиванию. При работе с сулемой не допускается использование металлических инструментов. Сулема - сильный яд!

⁶добавляется к готовой смеси непосредственно перед употреблением

⁷Раствор йода в водном растворе йодида калия. Состав: йод 1 г, йодид калия 2 г на 17 мл воды.

Для фрагментов однородной мягкой ткани толщиной 3-5 мм используют спирты 40, 70, 96-градусные, затем — абсолютный спирт (сменяется дважды). Фрагменты указанного размера держат в каждом из них по несколько часов:

	40	70	96	100
несколько часов:	2-4	4-6 (можно хранить)	6-12	6-12

Для очень нежных объектов концентрацию спирта повышают более плавно, например, 40-50-60-70-80-90-96-градусные, соответственно быстрее их сменяя. Очень мелкие объекты (до 2 мм) достаточно держать в каждом из четырех спиртов по 2-3 часа.

Обезвоженный материал пропитывают промежуточными средами, которые смешиваются как со спиртом, так и с парафином. Приведем некоторые варианты промежуточных сред.

1. В этом качестве наиболее употребимы близкие в этом отношении ксилол, толуол или бензол. Объект переносят в ксилол либо из абсолютного спирта, либо через смесь спирта и ксилола 1:1. Хорошо обезвоженный материал не мутнеет при переносе в ксилол. Ксилол сменяется дважды, кусочки толщиной 3-5 мм в нём держат 2-4 часа.

хлороформ - без воды,
спирта, ?осч? + протокол.

диоксан

метилсалицилат (или метилбензоат)

2. хлороформ
3. диоксан
4. метилсалицилат (или метилбензоат)

После промежуточных сред, материал пропитывают парафином. Объект переносят в смесь парафина с промежуточной средой (например, в смесь парафина и ксилола 1:1 при +37°C на 2-12 часов), затем в расплавленный парафин (+56°C, 2 смены по 4-6 часов).

Проводка материала занимает таким образом несколько дней, но существует несколько приёмов, позволяющих ускорить приготовление срезов.

1. использование автоматизированных систем (гистологических автоматов), которые осуществляют смену растворов по заданной схеме, при этом осуществляя постоянное перемешивание, что позволяет заметно сократить продолжительность проводки.
2. вырезать кусочки меньшего размера.
3. проводка в термостате при +37°C.
4. заливка через диоксан или ацетон.
5. использование для приготовления срезов замораживающих микротомов.

заливка в желатин.

Пропитанный парафином материал заливают в форму с расплавленным парафином, дают остыть, из полученного блока вырезают скальпелем пирамиду с основанием в форме трапеции, усеченную параллельно основанию на такой высоте, чтобы залитый материал оказался внутри пирамиды и вблизи сечения (см. рис. 2.2а).

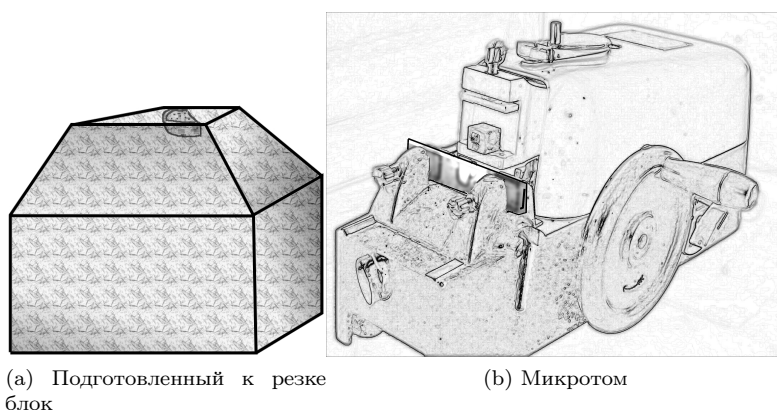


Рис. 2.2: Получение срезов

Получение срезов. Резку производят с помощью микротомы (см. рис. 2.2b) — прибора, осуществляющего в цикле подачу на заданное расстояние, определяющее толщину среза, и резкое опускание блока на стальной нож. Полученные срезы ложатся на нож (см. рис. 2.3), и оттуда препаровальными иглами их переносят на предметное стекло с предварительно нанесённым очень тонким слоем белка куриного яйца с глицерином (1:1, с добавлением тимола или иного антисептика) для улучшения адгезии.



Рис. 2.3: Получение срезов

Перед следующей процедурой — окрашиванием срезов — требуется заместить парафин водой, так как обычно используются красители на водной основе. Это делается по той же схеме, что и обезвоживание перед заливкой в парафин, в обратном порядке и быстрее, так как толщина срезов невелика. С различными способами окраски можно ознакомиться в главе 3.

Последним этапом является заключение срезов под покровное стекло в канадский бальзам.

В некоторых случаях нет возможности добиться сохранности исследуемых структур при химической фиксации (её удаётся заменить физической), проводке и заливке в парафин. Тогда для приготовления срезов используют замораживающий микротом. Таким способом не удастся получить тонкие срезы: их толщина обычно составляет 10-20 мкм, невозможно изготовить

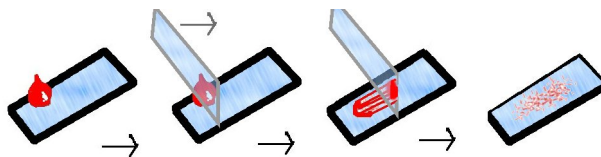


Рис. 2.4: Приготовление мазка крови

непрерывные серии срезов. Достоинством метода является отличная сохранность жировых включений, активности многих ферментов, сохранение антигенов, быстрота приготовления среза — не нужно готовить материал к заливке в парафин.

фиксация замораживанием.

заливка в желатин.

2.5 Цитологические препараты

2.5.1 Мазки и отпечатки.

Подготовка цитологических препаратов менее трудоемка и менее требовательна к технической оснащенности лаборатории. Готовый препарат можно получить быстро. Кроме того, применение этого метода не обязательно предполагает вмешательство — будь то взятие биопсии или изъятие органа у лабораторного животного — что выгодно отличает цитологическое исследование от получения гистологических срезов. Все это позволяет широко использовать такой метод в рутинных медицинских исследованиях.

Подготовка цитологического препарата, стекла с нанесенными на него клетками, производится по общей схеме: фиксация, окраска, при необходимости — обезвоживание и заключение в канадский бальзам под покровное стекло.

- Для приготовления сухих мазков крови на чистое предметное стекло наносят каплю крови и осторожно распределяют ее ровной боковой гранью другого предметного стекла (см. рис. 2.4). Мазок быстро высушивают и затем фиксируют (чтобы избежать изменений в структуре во время окрашивания), как правило в метаноле (3-5 минут), в 100% этаноле или в 100% этаноле и эфире в соотношении 1:1, затем вновь сушат. Для окрашивания мазков крови часто используют смеси, в состав которых входят азур, эозин, метиленовый синий, светлый зеленый (лихтгрюн) или другие красители.
- Исследование полового хроматина человека проводят на клетках среднего слоя слизистой оболочки ротовой полости (буккальный эпителий). Для этого шпателем снимают наружный слой с эпителия на внутренней поверхности щеки, затем другим концом шпателя делают соскоб в том же месте и этот материал распределяют на стекле. Мазки можно зафиксировать смесью 96% спирта и эфира в соотношении 1:1 в течение суток, быстро провести через 50 и 70% спирт и дистиллированную воду. Затем мазок помещают в 5М HCl, промывают и окрашивают толуидиновым синим.

(см:краски Романовского-Гимзы, Г-Эоз)

В 1955 г Моор и Барр описали метод определения полового хроматина в соскобах слизистой оболочки ротовой полости (буккальный тест).

- Отпечатки более плотных тканей обычно содержат менее деформированные клетки, чем мазки. Для приготовления отпечатка (например, костного мозга, легочной ткани и др.) из тканей ножницами или лезвием бритвы вырезают кусочки размером $1,5 \times 1,0 \times 1,5 \text{ см}^3$, при необходимости освобождают от крови, приложив к фильтровальной бумаге, и затем прикладывают поверхностью среза к предметному стеклу.

Наряду с обычными красителями, для подготовки цитологических препаратов возможно использовать гистохимические способы окраски, иногда с незначительным изменением протокола обработки.

см. р-я Фельгена, окр.по
Браше и др.)

2.5.2 Хромосомные препараты

2.5.3 Препараты политенных хромосом

2.6 Культура клеток

Выращивание клеток многоклеточных организмов на подложке в питательном растворе открывает перед исследователем много возможностей. Во-первых, что очень важно, такие клетки можно наблюдать прижизненно. Во-вторых, в большей или меньшей степени такие клетки воспроизводят особенности клеток той ткани, из которой они были получены (например, выделенные кардиомиоциты, заново образуя межклеточные контакты между собой, синхронно сокращаются).

Таким образом, практически любые задачи, связанные с исследованием клеточной дифференцировки, с механизмами клеточного деления и регуляции клеточного цикла, с возможностями адаптации и многие другие, решаются с применением метода культуры клеток. Кроме того, этот метод нашел широкое применение в медицине (от косметологии до диагностики онкологических заболеваний), в биотехнологии (производство вакцин и антител для научных исследований и многое другое). При испытании новых фармакологических препаратов клеточные культуры обязательно должны использоваться как тест-объект, предшествующий тестам на лабораторных животных.

2.6.1 Свойства клеток в культуре

Клеточные культуры, выделенные из какой-либо ткани многоклеточного организма, как правило, разнообразны по клеточному составу.

В зависимости от состава среды культивирования, меняется скорость их пролиферации и степень дифференцировки. В культуре клеток млекопитающих, полученной из эмбриональных тканей, как правило происходит более активный рост при меньшей дедифференцировке клеток, обычно сопутствующей получению культуры. В любом случае, такие культуры, выделенные непосредственно из тканей животного или человека (их называют первичными), как правило переживают лишь ограниченное число циклов, после чего культура «стареет», при этом клетки первичной культуры по своим свойствам не полностью идентичны клеткам в той ткани, из которой они получены. Этот факт необходимо учитывать при любой работе, предполагающей экстраполяцию данных, полученных на клетках *in vitro*, на клетки *in situ*.

Клетки первичной культуры могут быть в свою очередь субкультивированы. Для отделения их от подложки⁸ и друг от друга используются различные ферменты, как правило пептидазы (трипсин и другие), разведенные в буфере, не содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} или даже на растворе, включающем в состав хелатирующие агенты. Таким образом уменьшается способность клеток к адгезии и образованию клеточных контактов. Аналогичные растворы используются и для получения первичных культур. В этом случае часто приходится дополнять обработку ферментами, разрушающими межклеточный матрикс, например коллагеназой. Ферментативную обработку обычно предваряют (или даже заменяют) механическим измельчением ткани.

Субкультивирование меняет свойства клеточной культуры. Обычно пересев в большей степени выдерживают малодифференцированные клетки. Какие-то типы клеток, присутствовавшие в первичной культуре, могут полностью исчезнуть после пассажа.

Путем многостадийного субкультивирования нормальных клеток или из клеток злокачественной опухоли иногда удается получить пересеваемую культуру клеток, или постоянную клеточную линию. В идеале, это потому что одной клетки, недифференцированной или представляющие одну линию дифференцировки, сходные по своим свойствам и способные выдерживать неограниченное число пассажей без изменения свойств. Соответственно, основным достоинством пересеваемых культур является возможность наработки любого количества однотипного материала для длительных исследований, и возможность сопоставлять данные, полученные на одной клеточной линии в разное время и в различных лабораториях.

2.6.2 Основные приёмы работы с клеточными культурами.

протокол пересадки к-ры СПЭВ
протокол посадки к-ры
1ных фибробластов

В то время, когда работа с клетками не ведется, или же когда возникает необходимость сохранить пересеваемую культуру на длительное время, клетки суспензируют так же как при субкультивировании, затем центрифугируют, чтобы изменить состав среды на среду для заморозки, и замораживают при -50°C - -70°C . Разработанные для замораживания и размораживания клеток протоколы позволяют им сохранить жизнеспособность при данной процедуре.

протокол заморозки клеток СПЭВ

Метод культуры клеток невозможен без соблюдения условий стерильности. Чтобы снизить опасность микробного или бактериального заражения, в среду культивирования как правило добавляют антибиотики и антимикотики, кроме того, ёмкости с культурой или со средой культивирования открывают в ламинаре, всю работу проводят в отдельном чистом помещении (боксе). Ламинар (см. рис. 2.5) имеет рабочую поверхность, которую легко чистить, систему для стерилизации (обычно это лампа, дающая свет в том числе в короткой части УФ спектра), и систему вентиляции, в которой предусмотрена тонкая фильтрация поступающего в рабочую зону воздуха. Для работы с патогенными клетками используют ламинары, в которых предусмотрена рециркуляция воздуха в рабочей зоне, и оператор полно-

⁸Здесь и далее речь идет о монослойных культурах. Для субкультивирования суспензионных культур их разводят новой средой культивирования.



Рис. 2.5: Ламинар

стью огражден от контакта с рабочей зоной, что в совокупности исключает возможность заражения от образца.

Условия, пригодные для поддержания монослойных клеточных культур, определяются свойствами подложки, составом омывающего раствора и газовой фазы. В качестве подложки используют стекло (обычно - покровные стекла, вымытые в хромпике и стерилизованные) или полистирол. Для роста многих клеточных линий, и особенно клеток первичных культур, необходимо дополнительно использовать покрытие стекла или пластика, облегчающее адгезию клеток. Для создания такого покрытия обычно используют желатин, поли-L-лизин, коллаген или фибронектин.

Выбор оптимального состава ростовой среды, к сожалению, обычно производится эмпирически. Наиболее распространенные среды являются многокомпонентной смесью питательных веществ, неорганических солей и др., имеющей значительную буферную емкость. Однако такая среда не содержит белков, необходимых для деления и дифференцировки. Поэтому используют смеси таких сред с сывороткой плазмы крови (3-15% сыворотки). Для отдельных задач всё же требуется использовать среды фиксированного состава. Такие среды, называемые искусственными, приходится подбирать намного более индивидуально. Из-за необходимости вводить в состав таких сред гормоны и факторы роста, их стоимость несравненно выше, и всё же как правило естественные (содержащие сыворотку и т.п.) среды оказываются более благоприятными для роста клеток в культуре.

Состав среды культивирования и структура подложки влияют не только на выживание клеток, но и на их дифференцировку и пролиферацию, а следовательно определяют морфологию клетки и ее потомства, наличие тканеспецифических синтезов и прочее.

среда Игла, DMEM, M199 - состав; буфер ↔ газовая фаза

свойства сыворотки очень непостоянны. лошадь-бык-осел; партии; эмбр-неонатал-взросл примеры искусственных сред

примеры: кмц - неонатальные in situ -на стекле -на 3D матрике in vitro. кроветворного ряда или эмбриональные (ЭСК): диффка в завис от факторов.

2.6.3 Световая микроскопия монослойных клеточных культур.

Как и рассмотренные выше цитологические препараты (см.2.5.1), клеточные культуры могут быть зафиксированы, окрашены и заключены на предметном стекле в канадский бальзам.

Культуры клеток нашли широкое применение для иммуноцитохимических способов окраски (см. раздел 3.2.3) и гибридизации *in situ* (3.2.2), как правило - с флуоресцентными зондами. Достоинством культуры клеток перед гистологическими срезами является простота подготовки материала и большая надежность результата при лучшем качестве окраски. Флуорохромы со временем выгорают, и нет смысла делать постоянные препараты из материала, меченного флуоресцентными зондами. Для приготовления временных препаратов, покровное стекло с выращенными на нем клетками фиксируют, окрашивают (отмывают от несвязавшегося красителя) и заключают в гидрофильные заливочные среды на предметном стекле.

Уникальным свойством клеточных культур является возможность прижизненного наблюдения за клеткой. Такое наблюдение должно вестись в условиях⁹, полностью соответствующих условиям культивирования, если только речь не идет об экспериментальном воздействии.

(см. рис.)

Для наблюдения над живыми клетками можно использовать обычный микроскоп с объективом для водной иммерсии (он погружается в раствор, омывающий клетки), и позволяющий использовать физические методы контрастирования прозрачных объектов, такие как фазовый контраст или дифференциальный интерференционный контраст и другие.

Но значительные преимущества даёт использование инвертированного микроскопа (см. рис. 2.6), у которого объективы располагаются под наблюдаемым объектом, соответственно конденсор - над ним. Клетки для прижизненного наблюдения в инвертированный микроскоп на больших увеличениях (соответственно, с малым фокусным расстоянием) выращиваются на покровных стеклах или в специальных камерах. В таких системах есть возможность сохранить стерильность, что делает возможным проведение длительных наблюдений одного образца.

Помимо физических методов контрастирования, существуют разнообразные способы окраски живых культур (см. раздел 3.3), в том числе избирательные для каких-либо внутриклеточных структур или же направленные на повышение общего контраста.

2.7 Временные препараты

⁹температура, среда культивирования и состав газовой фазы



Рис. 2.6: Инвертированный микроскоп

Глава 3

Окрашивание и избирательное мечение

3.1 Общие методы окрашивания фиксированных препаратов

В этом разделе коротко описаны некоторые распространённые методы окрашивания, которые применяются в микроскопической технике. Следует учитывать, что результат окраски зависит и от выбора объекта, и от предшествующей обработки (фиксации, заливки и т.д.). Не существует универсальных способов окраски, пригодных для любых объектов. Выбор красителя и способа окраски зависит от целей и задач исследования.

Очень немного из истории. Распространенные методы окрашивания фиксированных препаратов, приведенные в данном разделе, разрабатывались с середины XIX века для изучения микроанатомии и гистологии на фиксированных препаратах. До середины XX века это был единственный способ увидеть тонкое строение органов, тканей и даже клеток.

Первоначально использовались натуральные красители, такие как кармин (позже - гематоксилин и многие другие), затем разнообразные анилиновые красители (например, метиленовая синька). По мере развития химии красителей (и технологии крашения шерсти, шелка) предпринимались попытки проанализировать, какие особенности организации клеток связаны со способностью окрашиваться теми или иными красителями.

Что какого цвета? Цветные вещества поглощают видимый свет по-разному в зависимости от длины волны. Поэтому каждое цветное вещество имеет характерную окраску и цвет, дополнительный к поглощаемому. Спектр поглощения (и, соответственно, окраска) определяется не атомным составом, а характером сопряжения орбиталей в молекуле. Окрашенное органическое вещество должно для этого содержать группы атомов, соединенных двойными связями - цветоносные группы, или хромофоры.

Но окрашенное вещество - еще не краситель. Краситель должен фиксироваться на субстрате, будь то текстильные волокна или клеточные компо-

ненты. Для этого необходима его способность к электролитической диссоциации, которая достигается введением так называемых ауксохромных групп, сообщающих соединению основной (амидная - NH_2) или кислый (гидроксильная - OH , карбоксильная - COOH , сульфоксильная - HSO_3) характер.

3.1.1 Виды красителей.

Основные красители: $\text{X-NH}_3^+\text{Cl}^-$

Гистологические элементы, избирательно окрашивающиеся основными красителями, называются базофильными.

Кислые красители $\text{X-SO}_3^-\text{K}^+$

Гистологические элементы, избирательно окрашивающиеся кислыми красителями, называются оксифильными или ацидофильными.

Нейтральные красители X^+Y^-

Индифферентные - имеют цвет, но не являются красителями. Для окраски жиров используют вещества, имеющие цвет, очень хорошо растворимые в жирах и хуже - в исходном растворителе (судан III, красный шарлах и другие).

Адъективные красители (гематоксилин, кармин). Краситель (или цветное соединение, не являющееся красителем) с протравой (обычно - оксид трехвалентного металла: хром, железо, медь) образуют окрашенный стабильный комплекс (лак). Металл в составе протравы влияет на цвет комплекса.

Окрашивание - весьма сложный процесс, в котором играют роль как химические, так и физические факторы. Следует учитывать не только полярность красителя и субстрата, но и такие явления как адсорбция красящего вещества на поверхностях субстрата.

прогрессивная и регрессивная окр.; дифференцирование

Кармин. Кармин - экстракт кошенили, равнокрылых насекомых подотряда кокцид, которых издревле собирали и разводили ради получения стойкой и яркой красной краски. Пигмент накапливается в жировом теле и яичном желтке самок этих насекомых.

В гистологии кармин применяется для тотального окрашивания эмбрионов, мелких многоклеточных и простейших или для окраски клеточных ядер. Существует множество различных красителей, приготовленных из кармина, например - распространенный квасцовый кармин:

1 г кармина

4 г калийных квасцов

100 мл воды

Кипятить 20 минут, остудить, фильтровать, добавить тимол

Красят 2-24 часа, затем дифференцируют в подкисленном 70% спирте.

Можно докрасить цитоплазму, например светлым зелёным.

Гематоксилин. Гематоксилин - экстракт кампешевого дерева. Красный гематоксилин не является красителем, но легко окисляется на воздухе (приготовленные растворы гематоксилина оставляют для этого на 2-3 недели «вызревать», либо вводят в их состав сильные окислители) и превращается в фиолетовый и сильно красящий гематеин, который в свою очередь может дальше окисляться с образованием различных продуктов, непригодных для окрашивания. Ни гематоксилин, ни гематеин не могут дать окрашивания без протрав (соли алюминия, железа, меди, хрома, молибдена или ванадия), с которыми они образуют солеобразные соединения - лаки.

Ниже в качестве примера приведено несколько рецептов приготовления красителя.

Квасцовый гематоксилин по Караччи 0,5 г гематоксилина

25 г калийных квасцов

0,01 г K_2O_3

100 мл глицерина

400 мл дистиллированной воды

Красят 5-10 минут, затем препарат промывают 10 минут в проточной воде. Как правило красят прогрессивно, но можно дифференцировать подкисленным спиртом.

Железный гематоксилин по Гейденгайну Отдельно готовят краситель и протраву.

Протрава:

железные квасцы (отбирают светло-фиолетовые кристаллы) растворить 3% в воде.

Краситель:

0,5 г гематоксилина

10 мл 96% спирта

90 мл воды

краситель «созревает» месяц, затем разводится водой 1:1.

Краситель (быстрый способ):

1 г гематоксилина в 95 мл воды при кипении, затем добавить 5 мл жидкой карболовой кислоты.

Окраска препаратов:

1. срезы протравливают в Протраве 12-24 часа, или 1-2 часа при 45 – 50°C.
2. сполоснуть дистиллированной водой
3. окрашивать в Красителе 12-24 часа, или 1-2 часа при 45 – 50°C.
4. сполоснуть дистиллированной водой
5. дифференцировать в Протраве (лучше разбавить ее в 3 раза водой) под микроскопом.
6. промыть проточной водой от 15 минут до часа
7. докрасить можно 0,1% водным раствором эозина, кислым фуксином или светлым зеленым.

Основные анилиновые красители. Обычно используются для окраски ядра.

метиловый зеленый может использоваться для прижизненного окрашивания; поскольку он очень легко вымывается в спиртах, окрашенный препарат заключают в глицерин-желатин.

метиленовый синий

основной фуксин (карболовый фуксин по Цилю), можно докрасить цитоплазму светлым зеленым.

Кислые анилиновые красители как правило, окрашивают диффузно, увеличивая общий контраст препарата. Подбирают краситель контрастного цвета по отношению к основному красителю.

эозин

светлый зеленый

кислый фуксин

пикриновая кислота (окрашивает в желтый цвет)

оранж

Нейтральные красители. Часто используются эозинаты основных красителей (метиленового синего и фиолетового, метиленазура, толуидинового синего). Вариант применения таких красителей для окраски клеток крови был разработан Романовским, его модификации - окраски по Гимзе, по Паппенгейму и другие.

Метод Романовского.

1. фиксация мазков в метаноле 2-3 минуты или смесью спирта и эфира 1:1 - 20 минут.
2. красить 20 минут в растворе красителя (1 капля в 1 мл воды, рН 6,8-7,0). Краситель содержит смесь эозинатов метиленазура, метиленового фиолетового, метиленового синего в определённой пропорции.
3. сполоснуть водой, заключить.

см рис

Результат:

ядра	фиолетово-красные
базофильные гранулы	синие или сине-фиолетовые
эозинофильные гранулы	ярко-розовые
лимфоциты	синие с пурпурно-красными зёрнами
эритроциты	бледно-розовые
тромбоциты	синие

3.1.2 Сложные многокрасочные методы окрашивания.

Многокрасочные методы позволяют не только окрасить ядра и цитоплазму клеток, но и дифференцировать ткани, клеточные включения, волокна и другие структуры.

Метод Маллори Готовят смесь красителей:

0,5 г анилиновый синий

2 г оранж G

2 г щавелевая кислота

100 мл дистиллированная вода.

Смесь нагреть до кипения и после охлаждения фильтровать.

1. фиксация: лучше всего использовать фиксаторы, содержащие сулему. Если фиксация проводилась формалином, спиртом или смесью Буэна, можно поместить срез на 15-60 минут в смесь Ценкера, сполоснуть.
2. проводка и заливка в парафин, резка, проводка до воды.
3. 0,1% кислый фуксин - 3 мин.
4. промыть водой.
5. 1% фосфорномолибденовая кислота 3-5 мин.
6. промыть водой.
7. смесь красителей - 2 минуты.
8. промыть водой.
9. дифференцировать в 96% спирте.
10. проводка через 100% спирт, ксилол; заключение в канадский бальзам.

Результат:	ядра	желто-коричневые или желто-красные
	слизь	голубая
	мышцы	ярко-желтые
	нейроглия, ганглиозные клетки	красно-фиолетовые
	эритроциты	оранжевые
	волокна соединительной ткани	тёмно-синие

см рис

Метиловый зеленый - пиронин по Унна 0,15 г метиловый зеленый

0,25 г пиронин

2,5 мл 96% спирт

20 мл глицерин

карболовая кислота 0,5% - до 100 мл

Красить 20 минут, промыть водой, дифференцировать в абсолютном спирте.

Результат:	хроматин	зеленый
	базофильные элементы	разные оттенки красного

см рис

3.2 Избирательное окрашивание фиксированных препаратов.

Перед исследователем во многих случаях встает задача — определить, где находится в клетке (в ткани, органе, организме) конкретный белок, та или

иная последовательность нуклеотидов в составе нуклеиновой кислоты, какой-то определенный химический компонент. Разработано большое количество частных методик, позволяющих для разнообразных компонентов определить их точное расположение в клетке. Клеточные органеллы могут быть избирательно выявлены при окраске на их специфические компоненты. Ниже будут рассмотрены основные подходы, применяемые для избирательного мечения.

Всегда важно помнить, что выбор фиксатора играет решающую роль в сохранении тех или иных клеточных компонентов и структур. Когда речь идет о мечении водорастворимых небелковых соединений, химическая фиксация как правило не препятствует их вымыванию или перераспределению. Чтобы обойти эту проблему, приходится применять физические методы фиксации, например замораживание (и затем делать срезы на замораживающем микротоме). Вообще, подготовка образца перед проведением избирательного мечения часто более чувствительна к малейшим изменениям протокола и вместе с тем еще менее универсальна, чем классические гистологические методики. Отчасти поэтому все чаще акцент, где это возможно, смещается с окраски срезов на работу с клеточными культурами.

Изначально специфическое мечение пришло в гистологию с разработкой методов гистохимического окрашивания. Многие биохимические реакции удалось проводить на гистологических срезах: выявление триглицеридов, углеводов, полисахаридов, ДНК и огромное количество других реакций. Сюда же относятся методы выявления ферментов (или классов ферментов) по их активности.

Следующим прорывом стало внедрение метода радиоавтографии. Вводя в живое животное радиоактивное соединение, которое нужно локализовать (или его метаболический предшественник), можно затем определить расположение радиоактивной метки на срезе. Для этого срез покрывают фотоэмульсией, экспонируют и проявляют. Применение метода часто требует очень четкого представления о метаболизме исследуемого соединения, и зачастую - проведения сложных контрольных экспериментов, так как введенное вещество может метаболизироваться, и входящие в его состав (меченные) атомы могут перейти в состав совсем других молекул.

Специфическое выявление на препарате определенных белков и даже белковых доменов (иногда и других компонентов) стало возможным благодаря развитию иммуноцитохимических методов. В этом случае в качестве очень чувствительного и избирательного детектора используются антитела, которые высокоаффинны к искомому компоненту, но легко вымываются из препарата, если связывания не произошло. Обнаружить связавшиеся антитела можно, предварительно пометив их: введя радиоактивный изотоп в состав молекулы (методом радиоавтографии), можно конъюгировать их с ферментом, активность которого затем удастся обнаружить классическими гистохимическими методами, или с флуорофором (используя для просмотра препарата флуоресцентный, конфокальный или двухфотонный микроскоп), или с частицами золота, которые затем можно обнаружить в электронный микроскоп... Во всех случаях мечение антител - это процесс, чрезвычайно требовательный к возможностям лаборатории, где он проводится. Как и получение специфических антител к белку, особенно если он присутствует не в большом количестве. Выходят из положения таким образом: препарат обрабатывают первыми антителами, высокоспецифическими

уточнить

к искомому белку, но их не метят. Метят вторые антитела, полученные против постоянного участка первых антител, и ими обнаруживают первые антитела на препарате. Использование вторых антител имеет и ряд других преимуществ. уточнить

Высокоспецифическое выявление последовательностей нуклеотидов в составе нуклеиновых кислот проводится путем введения меченой комплементарной последовательности и проведения реакции гибридизации.

Ниже будут более подробно рассмотрены перечисленные подходы к введению специфической метки, а затем способы визуализации этой метки.

3.2.1 Гистохимия.

Задачей гистохимии является локализация химических соединений в клетках и тканях. Методические подходы, которые для этого используются, черпались из общегистологических протоколов и из данных биохимии и химии: выделенный материал подвергают лиофильной сушке (см. раздел 2.2.1), замораживанию-замещению или фиксируют; затем делают мазки, отпечатки или же заливают и готовят срезы; и уже на предметном стекле проводят химическую реакцию на выявление нужного компонента. см гл

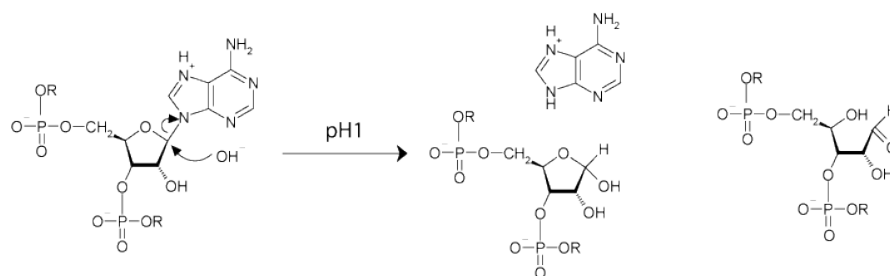
При выборе способа обработки материала важно не только сохранить локализацию и реакционную способность исследуемых веществ, но и добиться возможно более полного сохранения прижизненной структуры клеток и тканей.

Реакция Фельгена на ДНК.

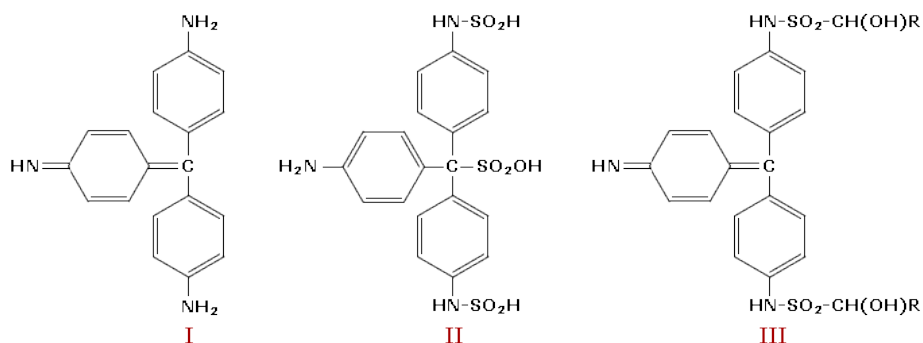
Реакция Фельгена выявляет ДНК очень специфично, причем яркость окраски пропорциональна количеству ДНК. С помощью именно этого метода (реакция Фельгена на срезах с последующей цитофотометрией) было показано, что ДНК играет роль в клеточном делении. Этим же методом была впервые показана полиплоидия клеток печени (гепатоцитов), а затем и некоторых других клеток; а также тот факт, что ДНК располагается по периферии активно работающего ядрышка, внутри же него содержится РНК. В настоящее время метод частично вытеснен столь же специфичными к ДНК флуоресцентными красителями, например DAPI (подробнее в 3.3.2).

Реакция проходит в два этапа (см. рис. 3.1). Сначала проходит кислотный гидролиз ДНК, при этом высвобождаются альдегидные группы дезоксирибозы, преимущественно у нуклеотидов, содержащих пуриновые основания. Затем проводится реакция Шиффа для выявления альдегидов, в ходе которой фуксинсернистая кислота взаимодействует с дезоксирибозами по альдегидной группе, при этом образуется протяженная сопряженная система, и продукт реакции приобретает красно-фиолетовую окраску.

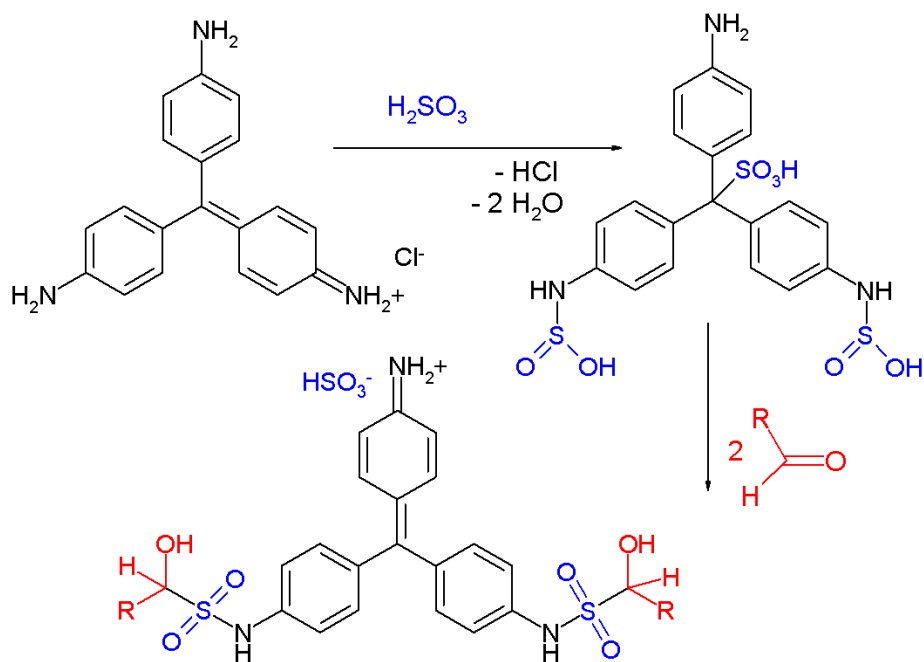
Препарат готовится по стандартной методике: можно пользоваться разнообразными химическими фиксаторами, для резки заливать в парафин. Срез подвергают мягкому кислотному гидролизу (3 н. HCl при 37С около 20 минут или 1N HCl при 60С несколько минут, время подбирается в зависимости от фиксатора). Промывают и помещают в реактив Шиффа на 40-50 минут при 37С. Промывают и заключают под покровное стекло.



(a) Кислотный гидролиз ДНК. 1N HCl при 60С несколько минут в зависимости от фиксатора.



(b) Фуксинсернистая кислота. Водный раствор фуксинсернистой к-ты (реактив Шиффа) служит для качественного обнаружения альдегидов. Для приготовления фуксинсернистой кислоты берут раствор пара-фуксина (I), имеющий красную окраску, прибавляют водный раствор оксида серы (IV) или пропускают газообразный SO₂. При этом образуется фуксинсернистая кислота (II), не имеющая окраски. Эта кислота с альдегидами RCHO образует хиноидный краситель (III) фиолетового цвета. Подпись и рис. с сайта <http://chemistry.ssu.samara.ru/chem4/o346.htm>



(c) Образование фуксинсернистой кислоты и ее реакция с альдегидами. рис. с сайта <http://en.wikipedia.org/wiki/File:SchiffReagentMechanismI.png>

Рис. 3.1: Реакция Фельгена на ДНК.

Выявление сукцинатдегидрогеназы.

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) и многие другие белки могут быть выявлены гистохимически очень избирательно по своей ферментативной активности. Для того чтобы сохранить активность фермента, вместо химической фиксации используют замораживание, а срезы готовят с помощью криостата. Лишь после проведения на срезе реакции материал дополнительно фиксируют химически.

Дегидрогеназы относятся к классу оксидоредуктаз, которым свойственно катализировать окислительно-восстановительные реакции — они переносят восстановительные эквиваленты от восстановителя (AH_2) к окислителю (B), то есть проводят реакцию $AH_2 + B \rightleftharpoons BH_2 + A$. В их числе и сукцинатдегидрогеназа — один из ферментов, участвующих в цикле Кребса в матриксе митохондрий.

В том месте, где на срезе есть активный фермент, можно провести реакцию, которую он катализирует, с веществом, которое после этого станет окрашенным. Для выявления дегидрогеназ используются различные соединения, такие как синий тетразолий (см. рис. 3.2) и другие бесцветные производные тетразолия. Они восстанавливаются в окрашенные соединения, которые остаются на препарате в местах своего образования.

Таким образом, при гистохимической окраске СДГ очень избирательно окрашиваются митохондрии.

Замороженные срезы подсушивают и инкубируют в буфере с субстратом (сукцинатом) и с производным тетразолия, иногда с добавлением двухвалентных катионов и ингибитора цитохромов¹ (иначе цитохромы конкурируют с проводимой СДГ реакцией за восстановительные эквиваленты). Окрашенный срез фиксируют 10% формалином 10-30 минут, промывают водой и либо промывают спиртом и заключают в глицерин-желатин, либо после обезвоживания — в бальзам (если выбран краситель, который не вымывается при обезвоживании).

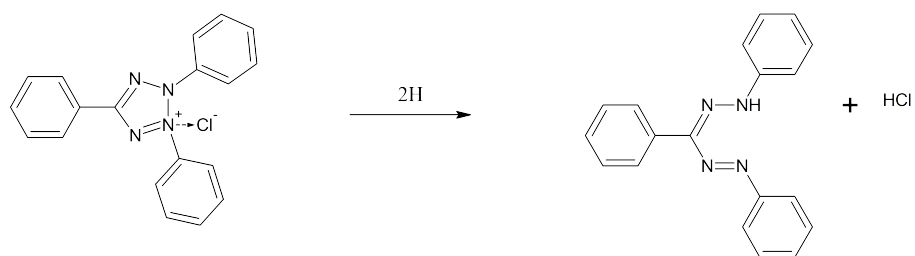
Выявление жиров суданом III по Дадди.

Для окраски жиров используются различные цветные вещества, растворимость которых в жирах во много раз выше, чем в исходном растворителе. Можно использовать судан III, судан IV, судан черный В и другие красители.

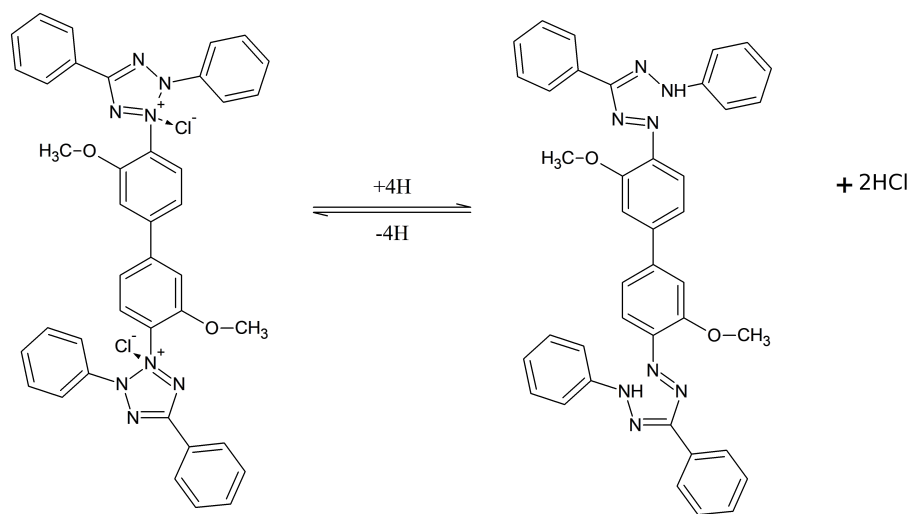
Чтобы исключить гидрофобные среды, в которых жиры могут растворяться, заливка в парафин не используется (материал готовится на замораживающем микротоме), заключение желательно производить не в канадский бальзам, а в смесь глицерина и желатина. Следует учесть, что при стандартных методах подготовки препарата жиры сохраняются плохо.

Материал фиксируют 10-20% формалином, на замораживающем микротоме делают срезы (либо на обычном микротоме, используя водорастворимые заливочные среды), окрашивают жирорастворимым красителем суданом III (насыщенный раствор, приготовленный на 70% спирте). До и после окраски промывают 50% спиртом. Предварительно можно докрасить ядра.

¹ например цианид калия



(a) Восстановление хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТХ) в формазан (красного цвета).



(b) Восстановление синего тетразолия в диформаза (синего цвета).

Рис. 3.2: Выявление дегидрогеназ с использованием солей тетразолия.

Для контроля специфичности реакции можно использовать материал, обработанный для экстракции липидов, например, ацетоном.

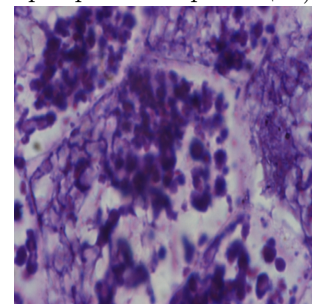
Окраска Шабадаша для выявления гликогена.

Гликоген - основной запасающий полисахарид животных. Его количество велико, метаболизм весьма интенсивен. При выделении фрагмента из организма животного прекращается поток крови к нему, и распад запасенного гликогена (гликогенолиз) компенсаторно резко усиливается. Таким образом, основные требования к фиксатору - это быстро проникать в ткань и тормозить гликогенолиз, хорошо фиксировать ткань, а также обеспечить нерастворимость гликогена. В качестве фиксатора может быть использована смесь Буэна или Буэна-Аллена, или же предложенные Шабадашем смеси, также на основе пикриновой кислоты; спирт и фиксатор Карнуа не препятствуют гликогенолизу и их использование нежелательно.

Заливка производится в парафин. На депарафинизированных срезах проводят реакцию с метайодной кислотой HIO_4 , которая окисляет 1,2-гликоли (-СНОН—СНОН-, в том числе глюкозных остатков, образующих гликоген) до альдегидов, с расщеплением С—С связи.² Принцип последующей реакции такой же, как и в реакции Фельгена (см. 3.2.1), т.е. проводится реакция Шиффа на альдегиды. Данную реакцию называют ШИК — реакция Шифф-йодной кислотой.³

Окисление срезов проводят при комнатной температуре 1% раствором метайодной кислоты 2-10 минут или 0,001-0,01М метапериодатом натрия 10-20 минут. После промывки срезы обрабатывают реактивом Шиффа 10-30 минут, промывают сернистой водой (на 100мл дистиллированной воды — 10мл 10% $KHSO_3$ и 10мл 1н. HCl), промывают, заключают под покрывное стекло.

Пример плохой фиксации (клетки печени; неравномерное распределение гликогена - артефакт фиксации):



3.2.2 Гибридизация In Situ

3.2.3 Иммуноцитохимия

Если после фиксации планируется метить определенный белок с помощью антител, выработанных к этому белку, то фиксатор должен не только не дать этому белку сместиться, «пришив» его, но и сохранить как можно лучше его конформацию, чтобы избежать потери тех форм поверхности белка, против которых вырабатывались антитела, - иными словами, сохранить антигенные свойства этого белка.

абзац убрать в иммуно-мечение

²Метайодная кислота окисляет до альдегидов многие соединения, но поскольку водорастворимые соединения утрачиваются во время подготовки препарата, в значимых количествах выявляются гликоген и гликопротеины.

³или англ. PAS, от periodic acid —Schiff

3.2.4 Радиоавтография.

3.2.5 Способы визуализации специфической метки.

Флуоресцентная метка

фермент

nanogold, ...

Радиоактивные изотопы

3.3 Прижизненное окрашивание.

3.3.1 Общие методы прижизненного окрашивания.

3.3.2 Избирательное прижизненное окрашивание.

DAPI

– это флуоресцентный краситель, избирательно связывающийся с двойной спиралью ДНК.

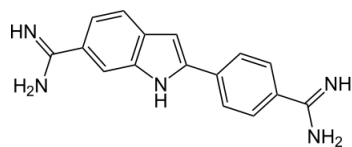


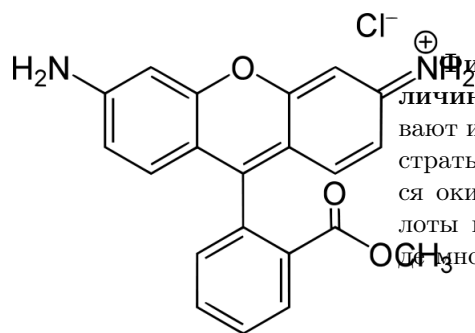
Рис. 3.3: DAPI

DAPI — сокращённый вариант английского названия 4', 6-диамидино-2-фенилиндола (см. рис. 3.3): 4',6-diamidino-2-phenylindole. Эта молекула прочно и специфично встраивается в малую бороздку двойной спирали ДНК. Способность DAPI проникать через клеточные мембраны позволяет использовать его как для фиксированных, так и для живых клеток. DAPI флуоресцирует синим цветом при освещении ультрафиолетом.

– это флуоресцентный краситель, избирательно связывающийся с двойной спиралью ДНК.

Родамин 123.

Родамин 123 (а также его производные – TMRM и TMRE) — флуоресцентный индикатор мембранного потенциала. Это амфифильный катион, способный проникать и через плазматическую мембрану, и через цитоплазму. Он накапливается на внутренней митохондриальной мембране в количестве, определяющемся величиной электрического митохондриального мембранного потенциала (ММП), так как сам положительно заряжен (см. рис. 3.4).



физиологическая значимость величины ММП. Митохондрии захватывают из цитоплазмы богатые энергией субстраты, которые в матриксе подвергаются окислительной деградации до углекислоты и воды. При этом, электроны в ходе многоступенчатой реакции переносятся

Рис. 3.4: Родамин 123

в итоге на молекулярный кислород. Основная часть выделяемой при этом энергии используется для создания градиента протонов. Электрохимический градиент, созданный накопленными на внешней стороне внутренней митохондриальной мембраны протонами, используется главным образом для работы АТФ-синтазы, регенерирующей затрачиваемый клеткой АТФ, а также для работы транспортных систем на внутренней митохондриальной мембране.

Глава 4

Электронная микроскопия клеток.

4.1 Электронный микроскоп.

Возникновение электронной оптики стало возможным благодаря открытию электрона и установлению его волновой природы. Как и другие заряженные частицы, электроны изменяют траекторию под действием электрических и магнитных полей.

Эти принципы легли в основу конструкции электронного микроскопа, в котором изображение формируется за счет прохождения пучка электронов через объект, а увеличивается с помощью электромагнитных линз. Принципиальная же оптическая схема просвечивающего, или трансмиссионного, электронного микроскопа (ТЭМ) мало чем отличается от обычного просвечивающего светового микроскопа.

см рис

4.1.1 Формирование изображения.

Проходя через препарат, электроны в различной степени изменяют свою траекторию. За счет этого изображение будет контрастным: если электрон беспрепятственно пролетел через препарат и не отклонился, он участвует в формировании изображения: формирует скрытое изображение в фотоэмульсии (если детектором служит фотопленка) или вызывает свечение очень малой области люминесцентного экрана. Если электрон отклонился и вышел за пределы пучка (не попал в объектив), он также не попадает и на детектор, и соответствующая область люминесцентного экрана останется темной (на фотопленке, соответствующие зерна эмульсии не получают электроны для создания центров скрытого изображения, соответственно область на проявленной негативной пленке останется светлой).

4.1.2 Разрешающая способность.

Одной из главных характеристик микроскопа является его разрешающая способность. У идеального микроскопа она ограничена дифракцией, и по- (см. свет.микр.) этому прямо пропорциональна длине волны электрона.

При ускорении электронов за счет разницы потенциалов между катодом и анодом, длина волны электрона зависит от ускоряющего напряжения (V):

$$V = \frac{m_e v_e^2}{2} \Rightarrow v_e = \sqrt{\frac{2V}{m_e}}; \lambda_e = \frac{h}{m_e v_e} = \sqrt{\frac{h^2}{2m_e V}}$$

Подставляя значения констант, получаем $\lambda_e = \sqrt{\frac{150}{V}}(\text{Å})$, где V — ускоряющее напряжение (В), то есть при $V=60$ кВ $\lambda_e = 0,05\text{Å}$.

Современные электронные микроскопы достигают разрешающей способности 0,05-0,1 нм (0,5-1 Å), но в получаемых изображениях биологических объектов разрешение дополнительно ограничивается свойствами образца (рассеянием в толще среза, размером зерна красителя или напыленного металла и другими). Разрешающая способность метода ТЭМ для биологических объектов не превышает 1-5 нм.

4.1.3 Элементарные основы конструкции просвечивающего электронного микроскопа.

В основе конструкции электронного микроскопа — электронная пушка (источник электронов и анод, придающие электрону скорость), и магнитные линзы, отклоняющие электрон.

При нагревании возрастает кинетическая энергия электронов, и она может стать достаточной для разрыва связи с веществом, в котором находился электрон. Явление испускания электронов при нагревании получило название термоэлектронная эмиссия. Так в электронной пушке и высвобождаются электроны.

см рис

Электронная пушка содержит нить накала, на которую подаётся напряжение порядка 100 кВ. под действием тока нить нагревается и испускает электроны, выполняя роль катода. Отделившиеся электроны концентрируются около катода благодаря защитному экрану катода, который заряжен слегка отрицательно по сравнению с катодом и отталкивает электроны. Напротив нити накала в защитном экране катода имеется отверстие — апертурная диафрагма, между ней и катодом и формируется электронное облако диаметром порядка 40-50 мкм.

Заземлённая пластина, анод, в центре имеет отверстие, проходя через которое электроны попадают на конденсор, оттуда сквозь препарат — на объектив, и через проекционную линзу — на фотопластинку либо люминесцентный экран.

Вся оптическая система микроскопа, от электронной пушки до люминесцентного экрана, погружена в глубокий вакуум: взаимодействуя с веществом, электроны теряли бы скорость и меняли направление движения. В вакууме же от анода пучок электронов расходится конусом, фокусируется затем линзой конденсора, проходит через препарат. В электронноплотных участках препарата электроны взаимодействуют с веществом и рассеиваются, выходят за пределы пучка, не попадают в просвет объектива не участвуют в формировании изображения. В электроннопрозрачных участках электроны продолжают движение практически без изменений, и, пройдя через систему линз, попадают на фотопластинку, засвечивая зерно пленки, либо на люминесцентный экран, вызывая его свечение.

Электромагнитная линза представляет собой катушку, витки которой расположены в плоскостях, перпендикулярных оси проходящего электрон-

ного пучка. Проходящий по проволоке катушки электрический ток создает магнитное поле, которое придает электрону ускорение, направленное перпендикулярно его движению. Поэтому электрон, движущийся сонаправленно силовым линиям магнитного поля, движется не по прямой, а по спирали, причем его отклонение (и тем самым - длина фокуса магнитной линзы) определяется силой приложенного к катушке тока.

4.2 ТЭМ в исследовании ультраструктуры биологических препаратов.

4.2.1 Подготовка тканей и клеток для ТЭМ.

Фиксация, проводка, заливка.

Приготовление ультратонких срезов.

Ультратомия эпоксидных срезов.

Криоультрамикротомия.

4.2.2 Окрашивание и избирательное мечение в ТЭМ.

Общее контрастирование ультратонких срезов.

Избирательное мечение в ТЭМ.

Радиоавтография в электронной микроскопии.

Иммуноголдинг.

4.2.3 Осторожно! Что мы видим?

артефаты

полноценный образец ткани

ориентирование материала

методы контроля артефактов: сопоставление с чужими рис., со свет микр, с методами замораживания-высушивания и з.-замещения

измерение структур

4.3 Исследование поверхностей в ТЭМ.

4.3.1 Негативное контрастирование.

Это очень простой метод исследования поверхностей небольших объектов, таких как вирусы, бактерии и выделенные органеллы, и даже макромолекулы. Объекты помещаются на формваровую подложку на бленде или сетке, так же как это делается с ультратонкими срезами. Потом наносится контрастёр (1-2% вольфрамовая кислота), который не способен проникать в объект. Контрастёр высушивается, при этом прозрачными для электронов

остаются только участки препарата, занятые образцом, а залитая электронноплотным веществом свободная подложка не прозрачна для электронов. По границе материала возникает зона, где форма поверхности определяет электронную плотность — эта зона и рассматривается.

4.3.2 Методы оттенения.

Общие принципы.

Методы оттенения используются для исследования поверхности, а значит не могут быть применены к ультратонким срезам, ведь поверхность срезов должна быть ровной, и уж во всяком случае она не содержит информации о структуре материала. Объектом обычно является поверхность вирусов или клеток, или же искусственно созданный разлом клетки или органелл. Для создания контраста (иными словами, чтобы что-то стало видно) на эту поверхность напыляют тяжелые металлы, например платину, из источника, расположенного не прямо над образцом, а под углом к нему. За выступающими объектами остаются «тени», куда при таком способе напыления металл не попадает, и на экране микроскопа они соответственно останутся светлыми,¹ тогда как области с напыленным металлом — тёмными, причем тем темнее, чем плотнее напылён металл и соответственно чем более данный участок поверхности обращён к источнику. Материал не зафиксирован, и поэтому его форма поверхности пострадает при длительном хранении, и даже при бомбардировке пучком электронов в микроскопе; к тому же образец крупный и может стать препятствием для электронов. Поэтому сразу после углового напыления металла поверхность покрывают прочным электроннопрозрачным слоем, и затем реплику отделяют от образца.

уточнить

уточнить!!!

Замораживание - травление.

В случае, когда объектом является искусственно созданный разлом клетки, разлом преимущественно проходит по поверхностям — по мембранам ядра, вакуолей, митохондрий, аппарата Гольджи; а иногда органеллы расщепляются, и на сколе оголяется их внутреннее содержимое.

хим. фиксация перед этим-???

Ткань пропитывают криопротектантом (глицерином), быстро замораживают до температуры жидкого азота, и лезвием бритвы производят разлом. Потом материал помещается в глубокий вакуум (10^{-6} – 10^{-7} мм.рт.ст.), в таких условиях происходит возгонка воды с поверхности скола, и на ней рельефно выделяются органеллы (проводят «травление»). Метод замораживания-скальвания подразумевает отсутствие «травления», в остальном подготовка образца ведётся так же.

а как там фиксируют-???

Метод предварительно оттенённых реплик.

Угловое и круговое напыление металла. В качестве напыляемого металла используют золото, платину, вольфрам, палладий и др.. Образец с подготовленной поверхностью помещают в вакуум, чтобы атомы и группы атомов напыляемого металла не рассеивались по пути от источника к

давление-???

¹Поэтому обычно бывает удобнее при работе с такими изображениями рассматривать негативы, где тени привычно тёмные.

поверхности, а летели по прямой. Иногда металл (платину) напыляют одновременно с углеродом, тогда платина не образует крупных зёрен, и разрешающая способность достигает 2-3 нм. Использование тантала позволяет достичь разрешающей способности метода в 1 нм, но обычно, без специальных усилий, полученный слой достигает 1-1,5 нм, размер зерна до 5 нм, разрешающая способность метода лежит в диапазоне 2-5 нм.

В некоторых случаях для получения изображения поверхностей более привычного вида проводят круговое напыление: всё так же, но столик, на котором находится объект, во время напыления вращается, и при глубоком рельефе поверхности зона полной тени уменьшается по сравнению с угловым напылением.

Тонкие плёночные реплики. Укрепление реплики проводят напылением углерода под прямым углом к поверхности, снова в вакууме (10^{-5} мм.рт.ст.), или же наносят на образец тонкий слой формвара.

Отмывают реплику от материала, погружая в горячую воду. Затем её очищают от остатков органики и помещают на опорную сетку.

В некоторых случаях удаётся избежать приготовления реплик при оттении: образец, высушенный на опорной плёнке (такой же как предназначенный для негативного контрастирования), оттеняют без дополнительной обработки, проводя угловое или круговое напыление.

4.4 СЭМ

Список иллюстраций

2.1	Общий вид гистологического препарата.	12
2.2	Получение срезов	19
2.3	Получение срезов	19
2.4	Приготовление мазка крови	20
2.5	Ламинар	23
2.6	Инвертированный микроскоп	25
3.1	Реакция Фельгена на ДНК.	34
3.2	Выявление дегидрогеназ с использованием солей тетразолия.	36
3.3	DAPI	38
3.4	Родамин 123	38